

**Untersuchungen zur Verteilung der erblichen
Alpha-1-Antitrypsin (Pi) - Typen**

Thomas Genz

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Anthropologie und Humangenetik der
Universität München

Direktor: Prof. Dr. H. Cleve

Untersuchungen zur Verteilung der erblichen Alpha-1-Anti-
trypsin (Pi) - Typen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Thomas Genz

aus

Schongau

Jahr

1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Spieß

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Dezember 1978



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methode	5
Ergebnisse	
pH-Gradient in den Gelen	8
Lage der Alpha-1-Antitrypsin-Banden im Gel	9
Identifizierung der Standards zur Typisierung der M-Untertypen	10
Pi^{Ma} , Pi^{Mb} und Pi^{Mc} als Pi^{M} -Untertypen	11
Vergleich der Banden der Pi^{M} -Untertypen	11
Lage der Banden der Pi^{M} -Untertypen im Vergleich zu verschiedenen Pi-Varianten	14
Weitere beobachtete Pi-Typen	15
Endgültiges Verfahren zur Pi-Typisierung	16
Verteilung der Pi-Typen und Genfrequenzen	18
Diskussion	20
Zusammenfassung	29
Literaturverzeichnis	30
Lebenslauf	

Einleitung

Alpha-1-Antitrypsin (al-at) ist der wichtigste Protease-Inhibitor (Pi) des menschlichen Normalserums (9, 44, 82, 85, 86). Es ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 50 000 (18, 79, 96) und einem isoelektrischen Punkt von etwa 4,3 (55). Seine Konzentration im normalen Serum beträgt 2,0 - 2,5 g/l; al-at bildet bei den routinemäßigen elektrophoretischen Methoden den Hauptteil der Alpha-1-Fraktion.

Seine physiologische Funktion ist nicht genau bekannt, jedoch wird angenommen, daß al-at vor allem die bei Entzündungen von den Leukozyten abgegebenen proteolytischen Enzyme hemmt (53, 82), da seine Konzentration im Verlauf von Entzündungen ansteigt (52, 53). Dieser Konzentrationsanstieg kann auch durch verschiedene unspezifische Reize provoziert werden (52, 69).

1963 wurde erstmals bei einem relativ jungen Patienten mit Lungenemphysem ein al-at-Mangel beschrieben (60). Eriksson fand 1965 in einem Kollektiv von 8000 Personen für Probanden mit "homozygotem al-at-Mangel" ein gegenüber Personen mit normalem al-at-Spiegel deutlich erhöhtes Risiko, frühzeitig an einem Lungenemphysem zu erkranken.

Zur Erkennung dieses al-at-Mangels wurden in der Folgezeit verschiedene Elektrophoresemethoden benützt, z.B. auf Membranen aus Celluloseacetat (71), in einem Agarose/Polyacrylamidgemisch (49, 50), in Agarose (46, 62) oder in Stärkegel (26).

Mit diesen Methoden wurde bei einigen Patienten mit Lungenemphysemen nicht nur das Fehlen von normalem al-at, sondern das Vorhandensein einer langsamer wandernden al-at-Variante beschrieben. Folgende Veröffentlichungen beschrieben verschiedene al-at-Varianten mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit (4, 20, 21, 22, 32, 38, 89).

Die wichtigste dieser Methoden war die Elektrophorese in Stärkegel mit einem diskontinuierlichen Puffersystem bei einem pH von etwa 4,95 (26). Zur genauen Typisierung wurde eine Immunelektrophorese in der zweiten Dimension oder eine Immunfixation (67) benötigt. Die Identifizierung einiger sehr seltener Typen erfordert zusätzlich die Verwendung anderer Elektrophoresemethoden (27, 46, 62).

Bis heute wurden mehr als 25 verschiedene Varianten beschrieben (16, 25, 28, 30, 31, 34, 59, 61, 73, 76, 92). Ihre Nomenklatur folgt bis heute der ersten von Fagerhol (33) vorgeschlagenen. Unseren heutigen Kenntnissen zufolge werden die Varianten von codominanten Allelen am Genlocus Pi codiert (25, 34). Der am weitesten verbreitete Pi-Typ weist in der Elektrophorese eine mittlere Beweglichkeit auf und wird M genannt; schnellere - weiter anodal wandernde - Typen wurden B, F etc. genannt, langsamere entsprechend S, Z etc. Nur einige dieser Varianten führen zu verminderten Serum-al-at-Spiegeln (24, 54). Die Frequenz für alle Varianten liegt in fast allen bisher untersuchten Populationen weit unter 0,1 (7, 11, 19, 23, 28, 35, 39, 92). Der erst in neuerer Zeit beschriebene Typ 0 oder - führt nicht wie Z zu stark verminderten al-at-Spiegeln, sondern zu gänzlichem Fehlen (2, 6, 63, 74, 75, 77, 87). Erst in letzter Zeit sind einige Varianten beschrieben worden (M_{Malton} und M_{Duarte}), die wie Z homozygot zu schwerem al-at-Mangel führen, im Gegensatz dazu aber heterozygot elektrophoretisch

nicht nachzuweisen sind (15, 68). Ihr Nachweis erfordert die Bestimmung des α_1 - α_2 -Spiegels (72) und, wenn möglich, auch die Untersuchung der Verwandtschaft des Probanden.

Ein verminderter α_1 - α_2 -Spiegel, wie er am häufigsten durch den Genotyp ZZ hervorgerufen wird, disponiert seinen Träger zur frühzeitigen Ausbildung eines schweren Lungenemphysems. Die Frage, ob auch Träger des Genotyps MZ vermehrt zum Auftreten von COPD (Chronical Obstructive Pulmonary Disease) neigen, bleibt bis heute umstritten. Auch über das Auftreten von schweren Lebercirrhosen bei Neugeborenen mit α_1 - α_2 -Defekten wurde berichtet (47, 84, 88).

In jüngster Zeit wurde auch die Isoelektrofokussierung zur Identifikation von Pi-Typen verwendet (1, 3, 55, 64, 65). Diese Methode bietet gegenüber der herkömmlichen Stärkegel-Elektrophorese erhebliche Vorteile. Sie ist technisch einfacher durchzuführen, sie benötigt kein Anti- α_1 - α_2 -Serum, nur drei anstelle von zehn Stunden, und sie erlaubt die Identifikation fast aller Pi-Typen bereits nach der ersten Dimension.

Schließlich ermöglicht sie auf Grund einer größeren Trennschärfe die Unterteilung des bisher Pi^M genannten Allels in mehrere neue Allele.

Zur Bestimmung der Genverteilung in einer gesunden Population wurde ein Kollektiv von 538 gesunden Individuen durch Isoelektrofokussierung untersucht. Ferner wurden Sera von 33 Kindern mit spastischen Bronchitiden typisiert.

Dabei sollte nicht nur die Häufigkeit der Typen MS, MZ, SS etc. untersucht, sondern auch für den bisher M genannten Typ eine Unterteilung in drei bereits beschriebene Untertypen vorgenommen werden.

Diese Untertypen waren in letzter Zeit mehrfach beschrieben und unterschiedlich genannt worden: der weiter anodal liegende Ein-Banden-Typ wurde dabei als M (8, 10, 45, 56, 93) oder M_1 (36, 37) bezeichnet; der kathodale Ein-Banden-Typ wurde M_1 (56), M_2 (36, 37), M_N (8, 45) oder N bzw. M_T (10, 93) genannt, das Doppelbandenmuster des vermuteten heterozygoten Untertyps entsprechend MM_1 (56), M_1M_2 (36, 37), MM_N (8, 45) oder MN bzw. MM_T (10, 93).

Material und Methode

Untersuchungsmaterial

Als Normalkollektiv wurden Sera von 538 gesunden Blutspendern und Laborpersonal untersucht. Ferner wurde ein Kollektiv von 33 Kindern mit spastischen Bronchitiden untersucht.

Nach der ersten Fokussierung wurden die Proben für spätere Untersuchungen bei -20 C eingefroren.

Die Isoelektrofokussierung in Polyacrylamidgel wurde in einem Multiphor^R-Gerät (LKB 2117) durchgeführt. Zur Herstellung eines geeigneten pH-Gradienten wurde Ampholine^R pH 3, 5-5, 0 (40 %, LKB) verwendet.

Herstellung der Gelplatten

Es wurden zwei Stammlösungen A: 29,1 % Acrylamid (Serva) und B: 0,9 % Bis-Acrylamid (Serva) angesetzt und filtriert. Bei +4 C konnten die Lösungen bis zur Verwendung mehrere Wochen ohne Verschlechterung der Ergebnisse aufbewahrt werden. Die Gele wurden jeweils am Tag der Fokussierung gegossen. Dazu wurden 4 g Saccharose in 20 ml destillierten Wassers gelöst und je 5 ml der Stammlösungen A und B sowie 1 ml Ampholine dazugegeben. Die Lösung wurde 2 min im Vakuum entgast. Anschließend wurde zur Polymerisation 1 ml einer frischen 1 %-igen Ammoniumpersulphat-Lösung dazugegeben. Das Gemisch wurde anschließend zwischen zwei durch eine Gummimaske getrennte Glasplatten pipettiert. Die Polymerisation erfolgte bei Zimmertemperatur in 20-30 min.

Das fertige Gel maß 23,5 x 11 cm. bei einer Stärke von 1 mm. Vor dem Lauf wurde das Gel auf +4 C gekühlt.

Durchführung der Isoelektrofokussierung

Filterpapierstücke von 5 x 5 mm (Schleicher & Schüll 2043a) wurden durch Eintauchen in das Serum mit dem Untersuchungsmaterial getränkt. Für jedes Filterpapier wurden etwa 5 mcl Serum benötigt. Die Papiere wurden anschließend 10 mm von der kathodalen Brücke auf das Polyacrylamidgel gelegt. Die einzelnen Proben hatten voneinander einen Abstand von etwa 0,5 mm. So konnten pro Lauf etwa 40 Proben untersucht werden.

Als anodale bzw. kathodale Brücke diente jeweils ein auf das Gel gelegter, 5 mm breiter und ca. 3 mm dicker Filterpapierstreifen, der an der Kathode mit 1 m NaOH, an der Anode mit 1 m H_3PO_4 getränkt war.

Der Lauf wurde mit einem konstanten Strom von 25 mA begonnen. Die Spannung betrug dabei 260-300 V und stieg innerhalb von 20 min auf 600 V. Dann wurde eine konstante Spannung von 600 V beibehalten, und der Strom fiel innerhalb einer Stunde auf 7-8 mA. Die Gesamtlauzeit der Isoelektrofokussierung betrug 3 Stunden.

Während des Laufs wurde das Gel durch fließendes Leitungswasser auf etwa +11 C gekühlt.

Eine 1/2-stündige Vorfokussierung vor dem Auftragen der Proben zur Entfernung des Ammoniumpersulphats aus dem Gel (53) erbrachte keine besseren Ergebnisse und wurde daher verlassen.

Fixieren und Färben

Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel 15 min in 12 %-iger Trichloressigsäure fixiert und über Nacht in einer Lösung von 0,5 g Coomassie Brilliant Blau in 200 ml Methanol, 70 ml Essigsäure und 830 ml destillierten Wassers gefärbt. Anschließend wurde 12 - 20 Stunden in einer gleichen Lösung ohne Zusatz von Coomassie Brilliant Blau entfärbt.

Bestimmung des pH-Gradienten im Gel

Zur Bestimmung des pH-Gradienten in dem Gel wurde sofort nach der Beendigung des Laufs ein 10 mm breiter Gelstreifen aus der Mitte der Platte herausgeschnitten und in Abständen von 5 mm unterteilt. Jedes Gelstück wurde 2 Stunden in je 1 ml deionisierten Wassers eluiert. Dann wurde der pH-Wert dieser Lösungen gemessen.

Ergebnisse

pH-Gradient in den Gelen

Mit der oben beschriebenen Methode der Isoelektrofokussierung konnte auf einer Strecke von 8 cm ein annähernd linearer pH-Gradient von pH 3,7 - 5,0 erzielt werden (Abb. 1).

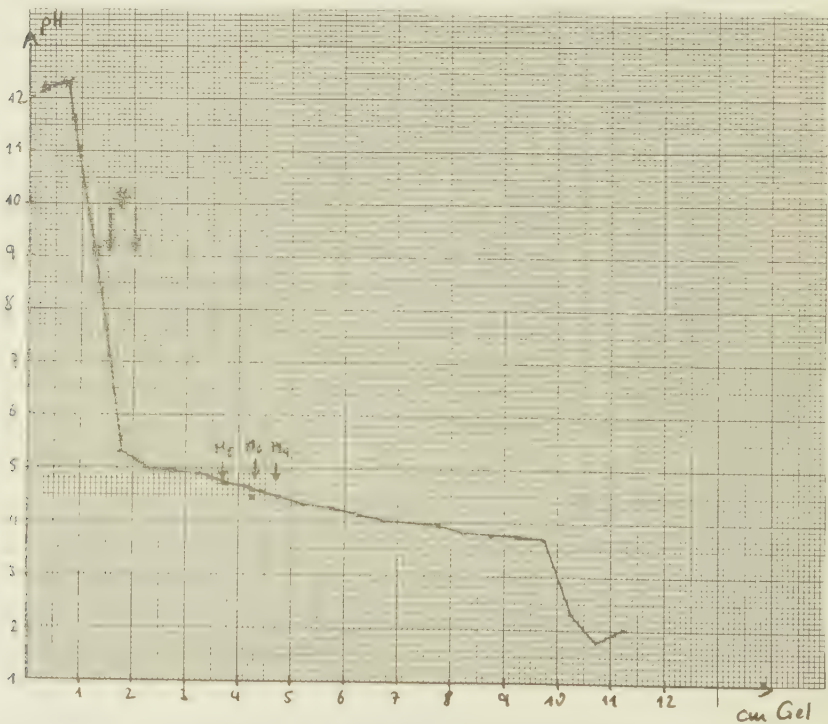


Abb. 1 - pH-Gradient im PAA-Gel. → ungefähre Lage der wichtigsten Alpha-1-Antitrypsin-Banden.

* Auftragstelle

Lage der Alpha-1-Antitrypsin-Banden im Gel

Abb. 2 zeigt ein PAA-Gel mit zwei Standards MZ* (Nr. 1 und Nr. 22) und 40 unselektierten Sera aus dem Normalkollektiv nach dem Fixieren und Färben. Am deutlichsten sichtbar sind die Banden M_4 , M_6 und M_8 nach der Nomenklatur von Fagerhol (24, 34). Am weitesten anodal liegt die Bande M_4 , M_6 und M_8 liegen weiter kathodal und weisen somit einen etwas höheren isoelektrischen Punkt auf.

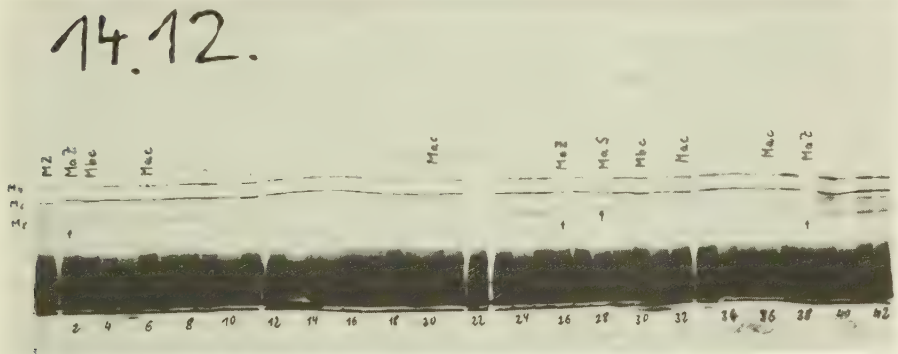


Abb. 2 - Ein PAA-Gel nach dem Färben. Genotypen von links nach rechts: 1. MZ (Standard), 2. MaZ, 3. Mbc, 4-5. Ma, 6. Mac, 7-8. Ma, 9. Mab, 10-11. Ma, 12-19. Ma, 20. Mac, 21. Ma, 22. MZ (Standard), 23-24. Ma, 25. Mab, 26. MaZ, 27. Ma, 28. MaS, 29. Ma, 30. Mbc, 31. Mab, 32. Mac, 33-35. Ma, 36. Mac, 37. Ma, 38. MaZ, 39-42. Ma
Deutlich zu erkennen sind die Banden S_6 (Nr. 28), Z_6 (Nr. 1, 2, 22, 26 und 38), die Doppelbanden der Mac-Sera (Nr. 6, 20, 32 und 36) und die deutlich weiter kathodal als bei Ma gelegene, breite Einfachbande zweier Mbc-Sera (Nr. 3 und 30).

* Wenn im Folgenden von "M" die Rede ist, handelt es sich um einen nicht bestimmten der hier beschriebenen sechs Untertypen.

Durch eine Immunelektrophorese mit Anti-Human-al-at in der zweiten Dimension (64, 65) wurde bestätigt, daß es sich bei den beschriebenen Banden tatsächlich um al-at handelt. Die restlichen Serumproteine mit einem höheren isoelektrischen Punkt liegen um die Auftragstelle in der Nähe der Kathode.

Identifizierung der Standards zur Typisierung der M-Untertypen

Zunächst wurden Sera unselektiert zusammen mit einigen Standards bekannten Genotyps einer Isoelektrofokussierung unterzogen. Als Standards wurden meistens Sera der Typen MS und MZ verwendet.

Sera des Typs M_1M_2 (nach Frants et al.: 36, 37) konnten auf Grund des typischen Doppelbandenmusters bereits nach dem ersten Lauf eindeutig klassifiziert werden.

Homozygote sollten dann durch ein von Küppers beschriebenes Verfahren (56) typisiert werden. Dabei wird das zu typisierende Serum mit einem Standard des jeweils anderen homozygoten Typs im Verhältnis 1:1 gemischt. Das Gemisch zeigt nach der Fokussierung das charakteristische Doppelbandenmuster der Heterozygoten.

In jeder aufgetragenen Probe von 40 Sera waren mehrere " M_1 " vorhanden, die neben einem Heterozygoten eindeutig bestätigt werden konnten und dann als Standards zur Verfügung standen. Sera, deren Banden etwas weiter kathodal lagen, wurden einem weiteren Lauf neben einem Heterozygoten unterzogen. Ferner wurden sie mit einem " M_1 "-Standard gemischt; ergab sich dann nach der Fokussierung eine Doppelbande, so war die Klassifizierung als " M_2 " eindeutig. Sie dienten dann für weitere Isoelektrofokussierungen als Standard-" M_2 ".

Pi^{Ma}, Pi^{Mb} und Pi^{Mc} als Pi^M-Untertypen

Bei der Typisierung der Homozygoten nach dieser Methode ergab sich des Öfteren die Schwierigkeit, daß einige als "M₂?" klassifizierte Sera, gemischt mit einem "M₁"-Standard, und einige als "M₁?" klassifizierte Sera, gemischt mit einem "M₂"-Standard, nicht die erwartete Doppelbande zeigten, sondern lediglich eine stark verbreiterte, unscharfe Einfachbande. Eine Wiederholung des Laufs, mit einer Mischung der fraglichen Sera sowohl mit einem "M₁"- als auch mit einem "M₂"-Standard, ergab in keinem dieser Fälle eine Doppelbande, so daß diese Sera weder als "M₁" noch als "M₂" klassifiziert werden konnten. Zwei zunächst als "M₂"Z klassifizierte Sera ergaben ebenfalls weder in Mischung mit "M₁" noch mit "M₂" eine Doppelbande. Da lediglich frische Sera verwendet wurden, fiel auch eine Denaturierung der Proteine als Ursache für die Verbreiterung der Banden aus.

Daher wurde eine weitere Unterteilung des Typs "M" postuliert. Entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit wurden die sechs möglichen M-Untertypen als Ma (am weitesten anodal), Mb, Mc, Mab, Mac und Mbc bezeichnet. Sie werden vermutlich von drei hypothetischen Genen Pi^{Ma}, Pi^{Mb} und Pi^{Mc} codiert, die zu den bisher beschriebenen Allelen am Genlocus Pi codominant sind.

Vergleich der Banden der Pi^M-Untertypen

Abb. 3 zeigt eine schematische Darstellung der wichtigsten al-at-Banden M₄, M₆ und M₈ der sechs hier beschriebenen M-Untertypen im Vergleich zu den Banden S₄ und S₆ des

Typs SS. Dabei ist für die Unterscheidung der Untertypen nicht nur die Lage der Banden, sondern auch ihre Breite ausschlaggebend.

Abb. 4 zeigt fünf verschiedene Ein-Banden-Muster der postulierten M-Untertypen. Die Banden der Untertypen Ma, Mb und Mc sind verhältnismäßig scharf und schmal. Die Banden der Untertypen Mab und Mbc sind breiter und etwas verschwommen. Das kommt in den Banden M_6 und M_8 besser zur Geltung als in M_4 .

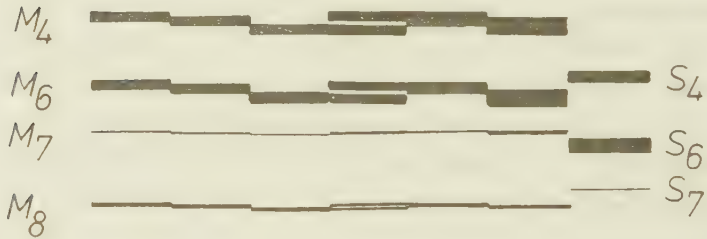


Abb. 3 - Ma - Mb - Mc - Mac - Mab - Mbc - SS

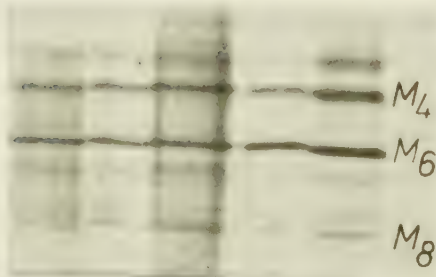


Abb. 4 - Mc - Mb - Ma - Mab - Mbc. Die Mab- und Mbc-Banden sind breiter und unschärfer als die der homozygoten Typen.

Abb. 5 zeigt nochmals vier der beschriebenen M-Untertypen. Dabei ist die Doppelbande des Typs Mac deutlich zu identifizieren; ebenso ist zu erkennen, daß die Banden M_6 und M_8 bei den Typen Mab und Mbc deutlich schwächer, aber breiter sind als beim Typ Ma bzw. als die einzelnen Banden des Typs Mac.

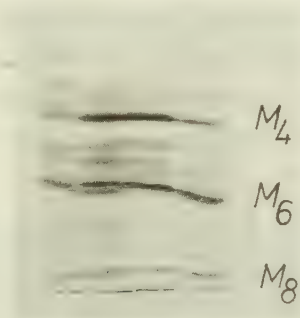


Abb. 5 - Mbc - Mac - Ma - Mab. Die Mac-Doppelbande ist deutlich zu erkennen. Die breite Mbc-Bande zeigt fast eine Aufspaltung in zwei Banden, wobei der weiter anodal gelegene Bandenanteil noch deutlich weiter kathodal liegt als der Ma-Anteil des Typs Mac. Auch die Mab_6 -Bande ist deutlich breiter als der Ma Anteil des Typs Mac.

Die Banden des Typs Mb liegen nicht exakt in der Mitte zwischen den Banden der Typen Ma und Mc, sondern etwas näher an den Ma- als an den Mc-Banden. Daher erscheinen die Banden M_4 , M_6 und M_8 des Typs Mbc deutlich breiter als die entsprechenden Banden des Typs Mab. Daraus ergeben sich einige Schwierigkeiten bei der Klassifizierung.

Lage der Banden der Pi^{M} -Untertypen im Vergleich zu verschiedenen Pi -Varianten

Abb. 6 zeigt die drei Typen MaS, MbS und McS im Vergleich mit einem Serum vom homozygoten Typ SS. Dabei wird deutlich, daß die Banden Ma_6 und Ma_8 beinahe mit den Banden S_4 bzw. S_7 zusammenfallen und so eine breite Einfachbande bilden. Im Gegensatz dazu ist bei den entsprechenden Banden der Typen MbS und McS jeweils eine Doppelbande zu sehen, deren einzelne Banden mehr oder weniger weit auseinander liegen. Das erlaubt auf Anhieb eine eindeutige Identifizierung dieser Phänotypen.

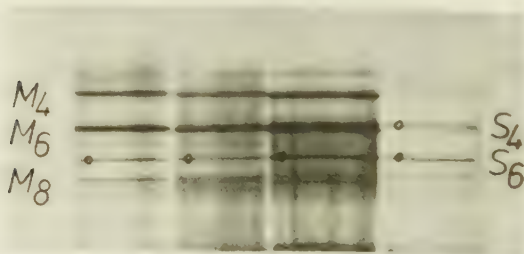


Abb. 6 - MaS - MbS - McS - SS. Die M_6/S_4 und M_8/S_7 - Doppelbanden liegen bei McS deutlich weiter auseinander als bei MbS.

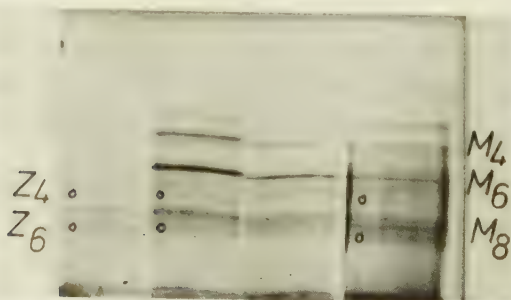


Abb. 7 - ZZ - MaZ - McZ - MbZ. Die Z-Banden sind bei McZ bereits verschwunden, Z_6 ist bei MbZ deutlich verbreitert. Die kräftige Bande zwischen Z_4 und Z_6 beim ZZ-Serum ist ein Artefakt.

Abb. 7 zeigt die Pi-Typen ZZ, MaZ, McZ und MbZ. Die Z-Banden sind wesentlich schwächer als die M-Banden und liegen weiter kathodal. Sie sind in der Isoelektrofokussierung deutlich erkennbar, wenn die Sera frisch sind oder nur wenige Male eingefroren und wieder aufgetaut worden waren. Bei zu häufigem oder zu langem Einfrieren wird das Bandenmuster aller Pi-Typen verändert. Dabei verschwinden zunächst die relativ schwachen Banden des Z-Typs: ein MZ-Serum kann dann fälschlicherweise als M angesprochen werden. So konnte z.B. das Serum Nr. 3 in Abb. 7 frisch eindeutig als McZ klassifiziert werden. Nach mehrmaliger Verwendung als Standard zeigte dieses Serum jedoch nur noch ein Mc-Muster.

Auch einige frisch als M typisierte Sera zeigten nach einiger Zeit Bandenmuster, die an die selteneren Pi-Typen EM, IM oder auch SS erinnerten; diese Muster waren jedoch als artefizielle, lagerungsbedingte Pi-Phänotypen zu betrachten.

Weitere beobachtete Pi-Typen

Außer den oben beschriebenen M-Untertypen und den relativ häufigen Typen MS und MZ wurden in den beiden untersuchten Kollektiven noch einige andere, seltene Pi-Typen gefunden. Abb. 8 zeigt die Typen Ma und S neben den Typen IMa, MaP und MaV?. Die Typen IMa und MaP konnten neben Standards bekannten Typs bestätigt werden; für das provisorisch als MaV? klassifizierte Serum stand leider kein entsprechender Standard zur Verfügung, so daß eine endgültige Klassifizierung nicht durchgeführt werden konnte.

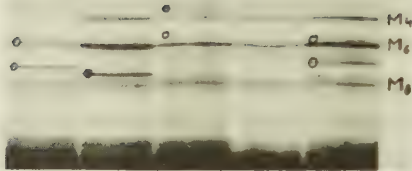


Abb. 8 - S - MaV? - IMa - Ma - MaP

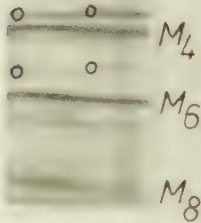


Abb. 9 - L?Ma - IMa

Abb. 9 zeigt neben einem Serum des Typs IMa das Muster eines zweiten Serums, das ebenfalls nicht endgültig klassifiziert werden konnte. Nach der Lage der Hauptbanden im Vergleich mit den I- und M-Banden handelt es sich aber wohl um den bereits beschriebenen Typ L?Ma (92).

Endgültiges Verfahren zur Pi-Typisierung

Zur Typisierung sämtlicher Sera wurde nun das im Folgenden beschriebene Verfahren benutzt: nach dem ersten Lauf unselektierter Sera konnten sämtliche Sera des Typs Mac am Doppelbandenmuster eindeutig identifiziert werden. Auch die Typen MaS, MbS, McS, S, MaZ, MbZ und McZ konnten bereits nach dem ersten Lauf auf Grund des Abstandes der Banden M_6 - S_4 bzw. M_8 - Z_6 mit relativ großer Sicherheit bestimmt werden.

Trotzdem wurde noch mit jedem dieser Sera zur Bestätigung der richtigen Typisierung ein Lauf direkt neben einem Ma/b/c-Standard und einem S- bzw. Z-Standard durchgeführt. Ebenso wurde mit Sera der Typen IM und MP verfahren.

Die meisten anderen Sera konnten ebenfalls nach dem ersten Lauf als Ma klassifiziert werden. Das anfänglich durchgeführte Mischen mit einem Mc-Serum wurde zuletzt nicht mehr durchgeführt.

Sera, die weiter kathodal lagen, deren Banden aber so scharf waren, daß ein homozygoter Untertyp wahrscheinlich war, wurden zunächst als Mb? bzw. Mc? klassifiziert. Zur genauen Typisierung dieser Sera wurden Mc?-Sera anfänglich mit einem Ma-Standard gemischt, um ein Doppelbandenmuster zu erhalten, später wurden sie nur noch zwischen einem Mb- und einem Mc-Standard fokussiert, wobei auf Grund der Lage der M_6 -Bande zu der der Standards ebenfalls eine eindeutige Zuordnung der fraglichen Sera möglich war. Mb?-Sera wurden zwischen Ma- und Mc-Standards und neben einem Mb-Standard fokussiert, wobei ebenfalls die Lage der M_6 -Bande zu denen der Standards ausschlaggebend für die Klassifizierung war.

Sera mit etwas breiteren, unscharfen Banden wurden zunächst, je nach der Lage ihrer Banden im Vergleich zu den Banden der übrigen Sera des Gels, als Ma/ab? oder Mbc/c? klassifiziert. Die genaue Zuordnung erfolgte ähnlich wie bei den homozygoten Mb- und Mc-Sera durch weitere Fokussierungen zwischen Ma- und Mb- bzw. zwischen Mb- und Mc-Standards. Ausschlaggebend war dabei, ob die M_6 -Bande des heterozygoten Untertyps deutlich breiter war als die der beiden entsprechenden homozygoten Untertypen und ob sie weiter nach anodal bzw. kathodal reichte.

Mischen eines Mab-Serums mit einem Mc-Serum bzw. eines Mbc-Serums mit einem Ma-Serum ergab erwartungsgemäß niemals eine Doppelbande, sondern stets eine sehr breite und unscharfe Einfachbande.

Eine achtestündige Fokussierung in dem gleichen Gel mit einer Spannung von 1000 V bei 5 mA über eine Strecke von 22 cm erbrachte keine bessere Trennschärfe. Eine Aufspaltung der breiten Mab- und Mbc-Einfachbanden in Doppelbanden konnte nicht erreicht werden.

Verteilung der Pi-Typen und Genfrequenzen

Tabelle 1 gibt die Verteilung der Pi-Typen in den beiden untersuchten Kollektiven wider. Kollektiv 1 sind 538 gesunde Personen, Kollektiv 2 33 Kinder mit spastischen Bronchitiden.

Die daraus errechneten Genfrequenzen betragen für Kollektiv 1 für Pi^{Ma} 0,75, für Pi^{Mb} 0,06, für Pi^{Mc} 0,15, für Pi^S 0,02 und für Pi^Z 0,01. Alle anderen Allele sind sehr selten, und ihre kombinierte Häufigkeit beträgt Pi^* 0,006.

Die Genfrequenzen im Kollektiv 2 waren für Pi^{Ma} 0,7, für Pi^{Mb} 0,06, für Pi^{Mc} 0,17 und für Pi^S 0,08. Andere Allele wurden in diesem Kollektiv nicht gefunden.

Tabelle 1

Genotyp	Kollektiv 1		Kollektiv 2	
	Anzahl	relativ	Anzahl	relativ
Ma	313	0,582	17	0,515
Mb	3	0,006	1	0,030
Mc	11	0,020	1	0,030
Mab	40	0,074	2	0,061
Mac	111	0,206	9	0,273
Mbc	19	0,035	-	0,000
MaS	14	0,026	1	0,030
MbS	2	0,004	-	0,000
McS	4	0,007	-	0,000
MaZ	11	0,020	-	0,000
McZ	2	0,004	-	0,000
IMa	2	0,004	-	0,000
IMc	1	0,002	-	0,000
MaP	1	0,002	-	0,000
L? Ma	1	0,002	-	0,000
MaV	1	0,002	-	0,000
SS	2	0,004	2	0,061

Diskussion

Die Annahme, daß die sechs hier beschriebenen M-Untertypen durch drei Allele codiert werden (Pi^{Ma} , Pi^{Mb} und Pi^{Mc}), die sich zu den bisher bereits beschriebenen Pi-Allelen codominant verhalten, muß durch Familienuntersuchungen bestätigt werden.

Die Untertypen Ma, Mab und Mb sind vermutlich eine weitere Unterteilung des bisher als M oder M_1 beschriebenen Untertyps. Der Untertyp Mac mit seinem charakteristischen Doppelbandenmuster entspricht dem bisher als MM_1 , M_1M_2 , MM_N oder MM_T bezeichneten Untertyp. Mbc und Mc dürften dementsprechend eine weitere Unterteilung des bisher als M_1 , M_2 , M_N oder M_T bezeichneten Untertyps sein.

Eine Zuordnung zu den von Johnson (46) nach Agargelelektrophorese mit anschließender Immunfixation beschriebenen Pi-Untertypen ist nicht eindeutig möglich. M_{Lamb} entspricht auf Grund seiner elektrophoretischen Beweglichkeit möglicherweise einem der anodalen Typen Ma oder Mb. M_{Bald} ist möglicherweise identisch mit Mc. Allerdings ist die Häufigkeit dieser M-Untertypen mit Genfrequenzen von 0,005 bei Weißen und 0,01 bei Schwarzen für $Pi^{M_{Bald}}$ und von 0,02 bei Weißen und 0,01 bei Schwarzen für $Pi^{M_{Lamb}}$ wesentlich geringer als die der hier beschriebenen Untertypen. Auch konnte kein einziger homozygoter M_{Lamb}^- oder M_{Bald}^- -Proband gefunden werden.

Eine Zuordnung zu der von Pierce et al. beschriebenen M-Variante (83) ist ebenfalls nicht möglich.

Es ist möglich, daß mit einer verbesserten Methode der Isoelektrofokussierung, sei es über eine längere Strecke oder durch Verwendung von Ampholine mit einem schmaleren pH-Bereich (93), die Klassifizierung der hier beschriebenen Pi-Untertypen erleichtert wird. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß mit derartigen verbesserten Trennmethoden eine weitere Aufteilung der beschriebenen Pi^{M} -Untertypen erreicht werden kann.

So erscheinen insbesondere die Banden des homozygoten Typs Mb manchmal etwas breiter und verschwommener als die Banden der homozygoten Typen Ma und Mc, so daß hier eventuell eine weitere Unterteilung erforderlich werden könnte.

Ein späterer Vergleich der provisorischen Klassifizierung nach dem ersten Lauf mit der endgültigen nach dem oben beschriebenen Verfahren zeigte, daß die Typen Mb, Mbc und Mc mit ziemlich großer Sicherheit bereits nach dem ersten Lauf identifiziert werden konnten. Da die Mb-Banden näher an den Banden des Typs Ma liegen als an denen des Typs Mc, ist der Unterschied in der Breite der Bande M_6 zwischen Mbc und Mb bzw. Mc erheblich größer als zwischen Mab und Ma bzw. Mb. Das führte dazu, daß zunächst relativ viele Sera als Ma/ab? klassifiziert wurden, von denen die meisten endgültig als Ma eingeordnet werden mußten.

Das dürfte zum Teil wohl auch auf die unterschiedlichen al-at-Konzentrationen in den einzelnen Sera, zum anderen Teil auf die nicht absolut einheitliche Menge des aufgetragenen Serums zurückzuführen sein. Entsprechend der höheren Menge an vorhandenem Protein verbreitert sich die Bande auch in der Isoelektrofokussierung etwas, wenn mehr Serum und damit mehr Protein aufgetragen wird.

Tabelle 2

Genotyp	beobachtet	erwartet	χ^2
Ma	313	302,6	0,3574
Mb	3	2,1	0,3857
Mc	11	11,7	0,0418
Mab	40	50,3	2,1091
Mac	111	119,2	0,5640
Mbc	19	9,9	8,3646
MaS	14	18,0	0,8888
MbS	2	1,5	0,1666
McS	4	3,5	0,0714
MaZ	11	9,8	0,1469
MbZ	-	0,8	0,8000
McZ	2	1,9	0,0052
Ma	5	4,5	0,0555
Mb	-	0,4	0,4000
Mc	1	0,9	0,0111
SS	2	0,3	9,6333
ZZ	-	0,08	0,0800
**	-	0,02	0,0200
SZ	-	0,3	0,3000
*S	-	0,1	0,1000
*Z	-	0,07	0,0700

Tab. 2 - Die Allele Pi^I , $Pi^{L?}$, Pi^P und $Pi^{V?}$ wurden der Übersichtlichkeit halber zu einem einzigen Allel Pi^* zusammengefaßt. Die Summe der χ^2 -Werte beträgt 24,5711. $n=20$. $P=0,20$.

Tabelle 2 vergleicht die Verteilung der Genotypen im Kollektiv 1 mit der zu erwartenden Normalverteilung in einem Kollektiv mit ausgeglichener Genverteilung. Die χ^2 -Werte wurden nicht für kleine Werte korrigiert. Trotzdem findet sich eine relativ gute Übereinstimmung zwischen den erwarteten und beobachteten Werten. Der hohe χ^2 -Wert für den Genotyp SS dürfte auf Zufall beruhen.

Die hohen χ^2 -Werte für die Genotypen Mab und Mbc spiegeln wahrscheinlich die schon oben angesprochenen Schwierigkeiten bei der Klassifizierung dieser beider Typen wider. Möglicherweise resultieren sie aber auch aus einer weiteren Unterteilung in andere M-Untertypen, die mit der hier beschriebenen Methode nicht unterschieden werden konnten. Es sind also möglicherweise einige Sera falsch klassifiziert worden.

Die Genfrequenzen für die Allele Pi^S und Pi^Z stimmen mit anderen Untersuchungen aus Deutschland überein. Kellermann und Walter (48) fanden Frequenzen von 0,02 für Pi^S und 0,009 für Pi^Z , Küppers (53) fand 0,025 für Pi^S und 0,003 für Pi^Z .

In nahezu allen bisher untersuchten Populationen wurden ähnliche Genfrequenzen für alle Allele gefunden, nur in Spanien und Portugal fanden sich höhere Frequenzen für Pi^S (35, 39).

Pi^{Ma} und Pi^{Mb} zusammen entsprechen vermutlich etwa dem bisher als Pi^M oder Pi^{M_1} bezeichneten Allel. Pi^{Mc} entspricht somit etwa dem bisher Pi^{M_1} , Pi^{M_2} , Pi^{M_N} oder $Pi^N (=Pi^{M_T})$ genannten Allel. Die hier gefundene Genfrequenz von 0,15 für Pi^{Mc} ist gleich der in den Niederlanden gefundenen für Pi^{M_N} (8, 45) und etwas höher als die für die weiße nordamerikanische Bevölkerung beschriebene von 0,09 für Pi^{M_1} (56).

In drei nach Abschluß meiner Untersuchung erschienenen Arbeiten wird die Existenz dreier Pi^M - "Untertypen", hier Pi^{M_1} , Pi^{M_3} und Pi^{M_2} (50), Pi^M , Pi^{M_3} und Pi^{M_1} (57) bzw. Pi^{M_1} , Pi^{M_2} und Pi^{M_3} (36a) genannt, bestätigt.

Die Wahrscheinlichkeit für die Existenz eines dritten - hier Pi^{M_3} genannten - Allels ergab sich zunächst aus den unterschiedlichen Doppelbandenmustern der Typen M_3S (MbS) und M_2S (McS) und den hohen χ^2 -Werten für die Typen M_1 , M_1M_2 und M_2 , wenn nur die beiden Allele Pi^{M_1} und Pi^{M_2} bei der Berechnung berücksichtigt wurden (50). Dagegen ergaben sich bei Berücksichtigung eines dritten, hypothetischen Allels (Pi^{M_3}) wesentlich günstigere χ^2 -Werte für die Bevölkerungsverteilung. Da keine Unterscheidung zwischen M_1 , M_1M_3 und M_3 bzw. zwischen M_3M_2 und M_2 getroffen werden konnte, wurden die Häufigkeiten lediglich geschätzt. Trotzdem ergibt sich bereits eine relativ gute Übereinstimmung der Genfrequenzen von Pi^{M_1} (Pi^{Ma}) = 0,721, Pi^{M_3} (Pi^{Mb}) = 0,112 und Pi^{M_2} (Pi^{Mc}) = 0,123 mit den hier vorliegenden Frequenzen.

In der zweiten Arbeit (57) konnte bereits auf Grund der breiteren Banden für MM_3 (Mab) und M_3M_1 (Mbc) und der Lage der M_3 (Mb)-Banden im Vergleich zu den M (Ma)- und M_1 (Mc)-Banden eine Unterscheidung der sechs Untertypen vorgenommen werden. Die in einer Stichprobe von US-Europiden gefundenen Frequenzen von 0,106 bzw. 0,215 für Pi^{M_3} (Pi^{Mb}) bzw. Pi^{M_1} (Pi^{Mc}) liegen etwas über, die von 0,617 für Pi^M (Pi^{Ma}) etwas unter den im hier untersuchten Normalkollektiv gefundenen Genfrequenzen.

Die dritte Arbeit (36a) bestätigt die hier vorliegenden Ergebnisse. In drei Stichproben verschiedener Herkunft konnten ebenfalls sechs M-Untertypen unterschieden werden. Die in den beiden europäischen Populationen gefundenen Genfrequenzen von 0,79 (0,75) für Pi^{M_1} (Pi^{Ma}), 0,12 (0,05) für Pi^{M_2} (Pi^{Mb}) und 0,08 (0,13) für Pi^{M_3} (Pi^{Mc}) sind nahezu gleich den hier gefundenen.

Die al-at-Konzentration im Serum scheint bei allen sechs Untertypen gleichermaßen im Normbereich zu liegen.

Sollte sich die Hypothese bestätigen, daß es sich bei Pi^{Ma} , Pi^{Mb} und Pi^{Mc} um drei zu den übrigen bisher bekannten Pi -Allelen codominante Allele handelt (anstelle des bisher Pi^M genannten Allels), so dürfte dieses Allelsystem auch in der Humangenetik - z.B. in der Vaterschaftsbegutachtung - an Bedeutung gewinnen. Legt man die hier gefundenen Genfrequenzen zu Grunde, so ist Pi^{Ma} das bei weitem häufigste Allel, und die Häufigkeit aller anderen Allele zusammen beträgt 0,25. Im Normalkollektiv weisen 0,428 aller Untersuchten einen von Ma verschiedenen Phänotyp auf. Dabei entfallen auf die übrigen M-Untertypen $Mab/Mac/Mb/Mbc/Mc$ zusammen 0,341.

Gedde-Dahl et al. (40) berichteten 1972 erstmals über eine mögliche Koppelung der Genloci Pi (al-at) und Gm (schwere Ketten der Immunglobuline IgG). Nach neueren Untersuchungen liegen die Rekombinationshäufigkeiten bei 0,19 für Männer und 0,26 für Frauen (41). Die bedeutendsten Unterschiede fanden sich bei Männern zwischen "Z-Familien" (0,10) und "Nicht-Z-Familien" (0,25).

Es ist seit längerem bekannt, daß ein Mangel an α_1 -at, wie er besonders durch die Allele Pi^Z und Pi^- hervorgerufen wird, zu schweren Beeinträchtigungen der Lungenfunktion führen kann. So ist der Prozentsatz an Personen mit dem Phänotyp Z, der im Serum nur etwa 0,3 g/l α_1 -at aufweist (im Vergleich zur normalen Konzentration von 2,0-2,5 g/l) bei Patienten mit COPD deutlich erhöht (20, 22, 38, 42). Die spezifische Trypsin-Hemm-Aktivität von Z- α_1 -at unterscheidet sich nicht von der des normalen M- α_1 -at, so daß die herabgesetzte Trypsin-Hemm-Kapazität bei ZZ- bzw. MZ-Individuen lediglich durch eine verminderte Anzahl von α_1 -at-Molekülen im Serum bedingt ist (96).

Der pathophysiologische Mechanismus dieser Ventilationsstörungen ist nicht bekannt. Da aber nicht jeder Träger des Genotyps ZZ ein Lungenemphysem entwickelt, sind sicher nicht nur die verminderte Trypsin-Hemm-Kapazität, sondern auch verschiedene andere Faktoren zu berücksichtigen (51, 58, 80).

Lange Zeit blieb die Frage umstritten, ob auch Individuen mit einem Genotyp MZ, MS oder SS, mit α_1 -at Spiegeln von 1,2 - 1,8 g/l, vermehrt zur Ausbildung von COPD disponiert sind (66, 95). Berücksichtigt man nicht nur die intermediäre α_1 -at-Konzentration im Serum, sondern die Genotypen (90), so scheint auch der Anteil an MZ-Individuen bei Patienten mit COPD erhöht zu sein, nicht jedoch der Anteil an Individuen mit MS oder SS (17, 81, 95).

Mit genaueren Untersuchungsmethoden lassen sich auch bei gesunden, nicht manifest erkrankten Individuen des Genotyps MZ - mit verringertem α_1 -at-Spiegel - Einschränkungen der Lungenfunktion nachweisen (12, 43).

Möglicherweise bedingt ein α_1 -at-Mangel auch durch verminder-
ten Schutz der Lungenoberfläche vermehrte Infektanfälligkeit.
Daraufhin wurden Sera von 33 Kindern mit spastischen Bronchi-
tiden untersucht. Dabei fand sich keine von der normalen Ver-
teilung abweichende Verteilung der Pi-Typen. Die Genotypen
MZ und ZZ wurden nicht gefunden.

Bei einigen Individuen mit dem Genotyp ZZ treten bereits im
Neugeborenenalter schwere Lebercirrhosen auf (47, 84, 88),
die mit einer vermehrten Speicherung von α_1 -at in den Leber-
zellen in Form von PAS-positiven Granula verbunden sind.
Diese Granula sind auch bei Erwachsenen mit Lungenemphysemen
nachweisbar (70). Auch das erst kürzlich beschriebene M_{Duarte} ,
das vermutlich mit M_{Malton} identisch ist und zu ähnlich gerin-
gen Konzentrationen im Serum führt wie Z, kann homozygot
ebenfalls zu COPD führen. Es ist ebenso wie Z- α_1 -at als PAS-
positive Granula in der Leber nachweisbar (68). Offenbar kann
bei diesen Typen das produzierte, abnorme α_1 -at nicht regel-
recht sezerniert werden (78).

Das Allel Pi^{-} führt homozygot ebenfalls zu schwerstem α_1 -at-
Mangel. Es sind Patienten mit Leberschäden (75), Lungenem-
physem (91) und Hautdefekten (87) beschrieben worden. Im
Gegensatz zu Pi^Z und Pi^M_{Malton} finden sich in den Leberzellen
dieser Probanden keine PAS-positiven Granula.

Die Aminosäuresequenz von α_1 -at ist bis jetzt nicht aufgeklärt.
Möglicherweise beruhen die elektrophoretisch darstellbaren Dif-
ferenzen zwischen den einzelnen Varianten auf mehreren verschie-
denen Aminosäuresubstitutionen (96). Andere Ergebnisse deuten
darauf hin, daß die unterschiedlichen elektrophoretischen Be-

weglichkeiten nicht - oder nicht ausschließlich - durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz bedingt sind, sondern daß Unterschiede im Gehalt an verschiedenen Zuckern und Sialinsäure (79, 96) dafür verantwortlich zu machen sind. So zeigt mit Neuraminidase behandeltes M-al-at ein elektrophoretisches Verhalten, das dem von Z-al-at ähnlich ist (5, 13, 14).

Es ist auch denkbar, daß ähnliche "Untertypen" wie für M auch für andere Allele existieren und nur auf Grund ihrer Seltenheit, und der kurzen Zeit, in der die Isoelektrofokussierung mit der dafür erforderlichen Trennschärfe zur Verfügung steht, bisher nicht beschrieben wurden. So weist z.B. das hier als L? klassifizierte al-at in der Isoelektrofokussierung eine Beweglichkeit auf, die sich zu der von I so verhält wie die von Mc zu der von Ma. Es handelt sich also möglicherweise um ähnliche Änderungen der Struktur. Eventuell gilt das gleiche für Typen wie W-W₂, Y-Y₂ oder F-"F", die sich bis jetzt durch unterschiedliche Beweglichkeiten in saurer Stärkegelelektrophorese und in Agargelelektrophorese bei pH 8,6 differenzieren lassen.

Zusammenfassung

Zur Bestimmung der Häufigkeit der einzelnen Allele am Genlocus Pi (Alpha-1-Antitrypsin) in der Bevölkerung wurden mittels Isoelektrofokussierung zwei Kollektive untersucht. Kollektiv 1 umfaßt 538 gesunde Personen, Kollektiv 2 33 Kinder mit spastischen Bronchitiden. -

Für den bisher "M" genannten Pi-Typ werden sechs Untertypen beschrieben, die durch drei hypothetische Allele Pi^{Ma} , Pi^{Mb} und Pi^{Mc} codiert werden. Für diese drei Allele wurden im Normalkollektiv Genfrequenzen von 0,75 für Pi^{Ma} , 0,06 für Pi^{Mb} und 0,15 für Pi^{Mc} gefunden. Für die übrigen Pi-Varianten wurden ähnliche Häufigkeiten wie in allen bisher untersuchten Populationen gefunden.

Zwischen den beiden untersuchten Kollektiven bestehen keine Unterschiede.

Weiterhin wird - auf Grund der hohen χ^2 -Werte für einige Typen - die mögliche Existenz weiterer Untertypen diskutiert.

Literatur

1. Allen, R.C., Harley, R.A., Talamo, R.C.
New method for determination of α_1 -antitrypsin phenotypes using isoelectric focusing on polyacrylamide gel slabs.
Amer. J. Clin. Path. 62: 732-739 (1974).
2. Altay, C., Fagerhol, M.K., Erdogan, N., Say, S.
Additional evidence for a deleted gene for serum α_1 -antitrypsin.
New Engl. J. Med. 289: 754 (1973)
3. Arnaud, Ph., Chapuis-Cellier, C., Creyssel, R.
The Pi system: Its study by means of thin-layer-gel-electrofocusing in polyacrylamide gel.
In: Protides of Biological Fluids, 22nd Colloquium 1974 (H. Peeters, ed.): 515-520
Oxford, Pergamon Press (1975)
4. Axelsson, U., Laurell, C.-B.
Hereditary variants of serum α_1 -antitrypsin.
Amer. J. Hum. Genet. 17: 466-472 (1965)
5. Bell, O., Carrell, R.W.
Basis of the defect in α_1 -antitrypsin deficiency.
Nature 243: 410-411 (1973)
6. Blundell, G., Cole, R.B., Nevin, N.C., Bradley, B.
 α_1 -antitrypsin null gene (Pi⁰).
Lancet II: 404 (1974)
7. Blundell, C., Frazer, A., Cole, R.B., Nevin, N.C.
 α_1 -antitrypsin phenotypes in Northern Ireland.
Ann. Hum. Genet. 38: 289-294 (1975)
8. van den Broek, W.G.M., Hoffmann, J.J.M.L., Dijkman, J.H.
A new, high frequency variant of α_1 -antitrypsin.
Hum. Genet. 34: 17-22 (1976)
9. Bundy, H.F., Mehl, J.W.
Trypsin inhibitors of human serum.
J. Biol. Chem. 233: 1124-1128 (1959)
10. Constans, J., Viau, M.
Une nouvelle mutation Pi^N au locus Pi dans les populations humaines.
C. R. Acad. Sci. (Paris) 281: 1361-1364 (1975)

11. Cook, P.J.L.
The genetics of α_1 -antitrypsin: A family study in England and Scotland.
Ann. Hum. Genet. 38: 275-287 (1975)
12. Cooper, D.M., Hoepfner, V.H., Cox, D.W., Zamel, N.,
Bryan, A.C., Levison, H.
Lung function in α_1 -antitrypsin heterozygotes (Pi-type MZ).
Am. Rev. Resp. Dis. 110: 708-715 (1975)
13. Cox, D.W.
Defect in α_1 -antitrypsin deficiency.
Lancet II: 844-845 (1973)
14. Cox, D.W.
The effects of neuraminidase on genetic variants of α_1 -antitrypsin.
Am. J. Hum. Genet. 27: 165-177 (1975)
15. Cox, D.W.
A new deficiency allele of α_1 -antitrypsin: Pi^M Malton.
In: Protides of Biological Fluids, 23rd Colloquium 1975
(H. Peeters, ed.): 375-378
Oxford, Pergamon Press (1976)
16. Cox, D.W., Cellhoffer, L.
Inherited variants of α_1 -antitrypsin: a new allele Pi^N .
Canad. J. Genet. Cytol. 16: 297-303 (1974)
17. Cox, D.W., Hoepfner, V.H., Levison, H.
Protease Inhibitors in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. The α_1 -Antitrypsin Heterozygote Controversy.
Am. Rev. Resp. Dis. 113: 601-606 (1976)
18. Crawford, I.E.
Purification and Properties of normal human α_1 -antitrypsin.
Arch. Biochem. Biophys. 156: 215-222 (1975)
19. Eriksson, S
Pulmonary emphysema and α_1 -antitrypsin deficiency.
Acta Med. Scand. 175: 197-205 (1964)
20. Eriksson, S.
Studies in α_1 -antitrypsin deficiency.
Acta Med. Scand. 175, Suppl. 432: 1-85 (1965)

21. Eriksson, S., Laurell, C.-B.
A new abnormal serum globulin α_1 -antitrypsin.
Acta Chem. Scand., Suppl. 1: 150-153 (1963)
22. Erksam, G., Kiviloog, J., Østling, E.
 α_1 -antitrypsin deficiency and chronic pulmonary disease.
Scand. J. Resp. Dis. 49: 311-321 (1968)
23. Fagerhol, M. K.
Serum Pi types in Norwegians.
Acta Path. Microbiol. Scand. 70: 421-428 (1967)
24. Fagerhol, M. K.
Quantitative studies on the inherited variants of serum
 α_1 -antitrypsin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 23: 97-103 (1969)
25. Fagerhol, M. K.
Genetics of the Pi system.
In: Pulmonary Emphysema and Proteolysis (C. Mittman, ed.):
123-131.
New York, Academic (1972)
26. Fagerhol, M. K.
Acid Starch Gel Electrophoresis for Detection of Alpha₁-Antitrypsin
Variants (Pi Types): Outline of Techniques Employed Currently.
In: Pulmonary Emphysema and Proteolysis (C. Mittman, ed.):
145-149.
New York, Academic (1972)
27. Fagerhol, M. K.
Pi-typing techniques.
In: Protides of Biological Fluids, 22nd Colloquium 1974
(H. Peeters, ed.): 493-495.
Oxford, Pergamon Press (1975)
28. Fagerhol, M. K., Brænd, M.
Serum-prealbumins: Polymorphism in man.
Science 149: 986-987 (1965)
29. Fagerhol, M. K., Eriksson, A. W., Mohn, E.
Serum Pi types in some Lappish and Finnish populations.
Human Heredity 19: 360-364 (1969)
30. Fagerhol, M. K., Gedde-Dahl, T.
Genetics of Pi-serum types.
Human Heredity 19: 345-359 (1969)

31. Fagerhol, M.K., Hauge, H.E.
The Pi-Phenotype MP.
Vox Sang. 15: 396-400 (1968)
32. Fagerhol, M.K., Hauge, H.E.
Serum Pi types in patients with pulmonary diseases.
Acta Allergologica XXIV: 107-114 (1969)
33. Fagerhol, M.K., Laurell, C.-B.
The polymorphism of prealbumins and α_1 -antitrypsin in human sera.
Clin. Chim. Acta 16: 199-203 (1967)
34. Fagerhol, M.K., Laurell, C.-B.
The Pi-sastem - inherited variants of α_1 -antitrypsin.
In: Progress in medical genetics (A.G. Steinberg, A.G. Bearn, eds.), Vol 7: 96-111.
New York, Grune and Stratton (1970)
35. Fagerhol, M.K., Tenfjord, O.W.
Serum Pi-types in some European, American, Asian and African populations.
Acta Path. Microbiol. Scand. 72.: 601-608 (1968)
36. Frants, R.R., Eriksson, A.W.
 α_1 -antitrypsin: Common subtypes of Pi^M .
Human Heredity 26: 435-440 (1976)
- 36a. Frants, R.R., Eriksson, A.W.
Reliable Classification of Six Pi^M Subtypes by Separator Isoelectric Focusing.
Human Heredity 28: 201-209 (1978)
37. Frants, R.R., Eriksson, A.W., Noordhoek, G.T.
Studies on a new common α_1 -antitrypsin variant.
17 th Dutch Fed. Meet. (1976)
38. Ganrot, P.O., Laurell, C.-B., Eriksson, S.
Obstructive lung disease and trypsin inhibitors in α_1 -antitrypsin deficiency.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 19: 205-208 (1967)
39. Geada, H.M., Pereira Albino, J.A., Manso, C.
Polymorphism of α_1 -Antitrypsin in a Portuguese Population.
Hum. Genet. 32: 109-113 (1976)
40. Gedde-Dahl, T. jr., Fagerhol, M.K., Cook, P.J.L., Noades, J.
Autosomal linkage between the Gm and Pi loci in man.
Ann. Hum. Genet. 35: 393-399 (1972)

41. Gedde-Dahl, T jr., Cook, P.J.L., Fagerhol, M.K., Pierce, J.A.
Improved estimate of the Gm-Pi-linkage.
Ann. Hum. Genet. 39: 43-50 (1975)
42. Greenberg, S.D., Jenkins, D.E., Stevens, P.M., Schweppe, H.I.
The lungs in homozygous α_1 -antitrypsin deficiency.
Am. J. Clin. Path. 60: 581-592 (1973)
43. Hall, W.J., Hyde, R.W., Schwartz, R.H., Mudholkar, G.S.,
Webb, D.R., Chaubey, Y.P., Townes, P.L.
Pulmonary Abnormalities in Intermediate Alpha-1-Antitrypsin
Deficiency.
J. Clin. Inv. 58: 1069-1077 (1976)
44. Heimbürger, N., Haupt, H., Schwick, H.G.
Proteinase inhibitors of human plasma.
In: Proceedings of the International Research Conference on
Proteinase Inhibitors (Fritz, H., Tscheche, H., eds.): 1-22.
New York, Walter de Gruyter (1971)
45. Hoffmann, J.J.M.L., van den Broek, W.G.M.
Distribution of Alpha-1-Antitrypsin Phenotypes in two Dutch
Population Groups.
Hum. Genet. 32: 43-48 (1976)
46. Johnson, A.M.
Genetic typing of α_1 -antitrypsin by immunofixation electro-
phoresis. Identification of subtypes of Pi^M .
J. Lab. Clin. Med. 87: 152-163 (1976)
47. Johnson, A.M., Alper, C.A.
Deficiency of α_1 -antitrypsin in childhood liver disease.
Pediatrics 46: 921-925 (1970)
48. Kellermann, G., Walter, H.
Investigations on the Population Genetics of the α_1 -Antitrypsin
Polymorphism.
Humangenetik 10: 145-150 (1970)
49. Klasen, E.C., Bogaart, A.M., Bernini, L.F.
Chemical Properties of α_1 -antitrypsin.
In: Protides of Biological Fluids, 22nd Colloquium 1974
(H. Peeters, ed.): 511-514.
Oxford, Pergamon Press (1975)
50. Klasen, E.C., Franken, C., Volkers, W.S., Bernini, L.F.
Population Genetics of α_1 -antitrypsin in the Netherlands.
Description of a New Electrophoretic Variant.
Hum. Genet. 37: 303-313 (1977)

51. Klayton, R., Fallat, R., Cohen, A.B.
Determinants of Chronical Obstructive Pulmonary Disease in patients with intermediate levels of α_1 -antitrypsin.
Am. Rev. Resp. Dis. 112: 71-75 (1975)
52. Küppers, F.
Genetically determined differences in the response of α_1 -antitrypsin levels in the human serum to typhoid vaccine.
Humangenetik 6: 207-214 (1968)
53. Küppers, F.
Alpha₁-antitrypsin: Physiology, Genetics and Pathology.
Humangenetik 11: 177-189 (1971)
54. Küppers, F.
Alpha₁-Antitrypsin Levels and Electrophoretic Patterns of Several Deficient Phenotypes.
Humangenetik 15: 1-6 (1972)
55. Küppers, F.
Determination of α_1 -antitrypsin phenotypes by isoelectric focusing in polyacrylamide gels.
J. Lab. Clin. Med. 88/1: 151-155 (1976)
56. Küppers, F.
 α_1 -Antitrypsin M₁: A new common genetically determined variant.
Am. J. Hum. Genet. 28: 370-377 (1976)
57. Küppers, F., Christopherson, M.J.
Alpha-1-Antitrypsin: Further genetic heterogeneity revealed by isoelectric focusing.
Am. J. Hum. Genet. 29: 65a (1977)
58. Larson, R.K., Barman, M.L., Küppers, F., Fudenberg, H.H.
Genetic and environmental determinants of chronic obstructive pulmonary disease.
Ann. Intern. Med. 72: 627-632 (1970)
59. Laurell, C.-B.
Electrophoretic microheterogeneity of serum alpha-1-antitrypsin.
Scand. J. Clin. Invest. 17: 407-408 (1966)
60. Laurell, C.-B., Eriksson, S.
The electrophoretic α_1 -globulin pattern of serum in α_1 -antitrypsin deficiency.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 15: 132-140 (1963)

61. Laurell, C.-B., Gustavsson, E.
A fast electrophoretic serum α_1 -antitrypsin variant.
Clin. Chim. Acta 15: 361-362 (1967)
62. Laurell, C.-B., Persson, U.
Analysis of plasma α_1 -antitrypsin variants and their micro-heterogeneity.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 310: 500-507 (1973)
63. Laurell, C.-B., Sveger, T., Unjunggren, C.B.
Alpha-1-antitrypsin deficiency Pi genotypes Z0, S0 and M0.
Acta Paed. Scand. 63: 855-857 (1974)
64. Lebas, J.
Two-dimensional immunoelectrofocusing for studying genetic polymorphism of α_1 -antitrypsin.
LKB application note No. 152 (1974)
65. Lebas, J., Hayem, A., Martin, J.-P.
Etude des variantes génétiques de l' α_1 -antitrypsine en immuno-electrofocalisation bidimensionnelle.
C. R. Acad. Sci. (D)(Paris) 278: 2359-2360 (1974)
66. Liebermann, J.
Heterozygous and homozygous alpha-1-antitrypsin deficiency in patients with pulmonary emphysema.
New Engl. J. Med. 281: 279-284 (1969)
67. Liebermann, J., Gaidulis, L.
Simplified α_1 -antitrypsin phenotyping by immunofixation of acid starch gels.
J. Lab. Clin. Med. 87/4: 710-715 (1976)
68. Liebermann, J., Gaidulis, L., Klotz, S.D.
A new Deficient Variant of α_1 -Antitrypsin (M_{Duarte}).
Am. Rev. Resp. Dis. 113: 31-36 (1976)
69. Liebermann, J., Mittman, C.
Dynamic response of α_1 -antitrypsin variants to diethyl-stilboestrol.
Am. J. Hum. Genet. 25: 610-617 (1973)
70. Liebermann, J., Mittman, C., Gordon, H.W.
Alpha-1-Antitrypsin in the livers of patients with emphysema.
Science 175: 63-65 (1972)

71. Liebermann, J., Mittman, C., Schneider, A.S.
Screening for homozygous and heterozygous α_1 -antitrypsin deficiency.
Protein electrophoresis on cellulose acetate membranes.
JAMA 210: 2055-2060 (1969)
72. Mancini, G., Carbonara, A., Heremans, J.F.
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry 2: 235-254 (1965)
73. Martin, J.-P.
The Pi-system: polymorphism of alpha-1-antitrypsin.
In: Protides of Biological Fluids, 22nd Colloquium 1974
(H. Peeters, ed.): 489-492
Oxford, Pergamon Press (1975)
74. Martin, J.-P., Ropartz, C.
Le déficit en alpha-1-antitrypsine et l'allèle Pi^{nul} .
Rev. Franç. Transf. 18: 27-45 (1975)
75. Martin, J.-P., Sesboue, R., Charlionet, R., Ropartz, C.
Does Alpha-1-Antitrypsin Pi Null Phenotype Exist?
Hum. Genet. : 121-125 (1975)
76. Martin, J.-P., Vandeville, D., Ropartz, C.
 Pi^B , a new allele of α_1 -antitrypsin genetic variants.
Biomed. Express 19: 395-398 (1973)
77. Martin, J.-P., Vandeville, D., Ropartz, C.
Alpha-1-antitrypsin deficiency: Pi^B .
Lancet II: 845 (1973)
78. Milford Ward, A.
 α_1 -Antitrypsin (Pi) Phenotypes in Neonatal Liver Disease.
In: Protides of the Chemical, Physical, and Survival Properties
(H. Peeters, ed.): 521-525
Oxford, Pergamon Press (1975)
79. Miller, R.R., Kuhlenschmidt, M.S., Coffee, C.J., Kuo, I., Glew, R.H.
Comparison of the Chemical, Physical, and Survival Properties
of Normal and Z-Variant α_1 -Antitrypsins.
J. Biol. Chem. 15: 4751-4757 (1976)
80. Mittman, J., Lieberman, J., Marasso, F., Miranda, A.
Smoking and chronic obstructive lung disease in α_1 -antitrypsin
deficiency.
Chest 60: 214-221 (1971)

81. Mittman, C., Liebermann, J., Rumsfeld, J.
Prevalence of abnormal protease inhibitor phenotypes in patients with chronic obstructive lung disease.
Am. Rev. Resp. Dis. 109: 295-296 (1974)
82. Ohlsson, K.
Neutral leucocyte proteases and elastase inhibited by plasma α_1 -antitrypsin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 28: 251-253 (1971)
83. Pierce, J.A., Eradio, B., Dew, T.A.
Antitrypsin phenotypes in St. Louis.
JAMA 231: 609-612 (1975)
84. Porter, C.A., Mowat, A.P., Cook, P.J.L., Haynes, D.W.G., Shilkin, K.B., Williams, R.
 α_1 -antitrypsin deficiency and neonatal hepatitis.
Brit. Med. J. 3: 435-439 (1972)
85. Schultze, H.E., Göllner, I., Heide, K., Schönenberger, K., Schwick, C.
Zur Kenntnis der α_1 -Globuline des menschlichen Normalserums.
Z. Naturforsch. 105: 463-473 (1955)
86. Schultze, H.E., Heide, K., Haupte, H.
 α -antitrypsin aus Humanserum.
Klin. Wschr. 40: 427-429 (1962)
87. Shandevyl, N., Hennebert, A., Leblanc, G., de Coster, A., Yernault, J.C., Achten, G., Ledoux, M., Buneaux, J.J.
Alpha-1-antitrypsin deficiency of the Pi type and connective tissue defect.
In: Alpha-1-antitrypsin and Pi-system Colloquium (J.-P. Martin, ed.) 97-107.
Paris, INSERM (1975)
88. Sharp, H.L., Bridges, R.A., Krivit, A., Freier, E.F.
Cirrhosis associated with α_1 -antitrypsin deficiency, a previous unrecognized disorder,
J. Lab. Clin. Med. 73: 934-939 (1969)
89. Talamo, R.C., Allen, J.D., Kahan, M.G., Austen, K.F.
Hereditary α_1 -antitrypsin deficiency.
New Engl. J. Med. 278: 345-351 (1968)
90. Talamo, R.C., Langley, C.E., Levine, B.W., Kazemi, H.
Genetic vs. quantitative analysis of serum α_1 -antitrypsin.
New Engl. J. Med. 287: 1067-1069 (1972)

91. Talamo, R.C., Langley, C.E., Reed, C.E., Makino, S.
 α_1 -Antitrypsin deficiency: a variant with no detectable α_1 -anti-
trypsin.
Science 181: 70-71 (1973)
92. Vandeville, D., Martin, J.-P., Ropartz, C.
 α_1 -antitrypsin polymorphism of a Bantu population: Description
of a new allele Pi^L .
Human Genet. 21: 33-38 (1974)
93. Viau, M., Constans, J., Bouissou, C.
Achievement of a linear gradient of one pH-unit in isoelectric
focusing.
Sci. Tools 24: 25-26 (1977)
94. Webb, D., Hyde, R.W., Schwartz, R.H., Hall, W.J., Condemi, J.J.,
Townes, P.L.
Serum α_1 -antitrypsin variants. Prevalence and clinical spiro-
metry.
Am. Rev. Resp. Dis. 108: 918-925 (1973)
95. Welch, M.H., Reinecke, M.E., Hammarsten, J.F., Guenter, C.A.
Antitrypsin deficiency in pulmonary disease: the significance of
intermediate levels.
Ann. Intern. Med. 71: 533-542 (1969)
96. Yoshida, A., Liebermann, J., Gaidulis, L., Ewing, C.
Molecular abnormality of human alpha-1-antitrypsin variant
(Pi-ZZ) associated with plasma deficiency.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 73, No. 4: 1324-1328 (1976)

Lebenslauf

Am 27. November 1952 wurde ich, Thomas Alfred Genz, als viertes Kind des Majors a.D. Alfred Genz und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Eichmann, in Bardenberg/Aachen geboren.

1959 wurde ich in Kempten/Allgäu eingeschult. Ich besuchte die Volksschule in Kempten und Bergzabern/Pfalz, wo ich 1963 auf das Gymnasium übertrat. Anschließend besuchte ich die Ecole Internationale in Fontainebleau und das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Schongau/Oberbayern, wo ich 1972 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. 1974 legte ich hier die Ärztliche Vorprüfung, 1975, 1977 und 1978 die Ärztliche Prüfung ab.

Vom Wintersemester 1975/76 bis Sommersemester 1977 arbeitete ich an der vorliegenden Dissertation.

Approbation als Arzt am 14. November 1978.

Herrn Professor Dr. H. Cleve danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die großzügige Unterstützung.

Herrn Dr. J.-P. Martin danke ich dafür, daß er einige meiner Typisierungen bestätigte und mir einige Referenzsera überließ.

Herrn Prof. Dr. Fruhmann und Herrn Dr. von Pilar danke ich dafür, daß sie mir Sera von Patienten zur Verfügung stellten.

